



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 วัตถุดิบหลัก

3.1.1.1 เมล็ดมะม่วงสายพันธุ์แก้ว

จัดหาเมล็ดมะม่วงสุกสายพันธุ์แก้วที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปมะม่วงอบแห้งในจังหวัดราชบุรี หลังจากได้เมล็ดมะม่วงแล้วนำมาแกะเปลือกแข็งออกให้เหลือแต่ส่วนเนื้อสีขาวด้านในที่เรียกว่า เมล็ดในมะม่วง (mango kernel หรือ mango seed almond) เก็บใส่ถุงพลาสติกโพลีเอทิลีนและปิดปากถุงให้สนิท แล้วนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18°C เพื่อการนำไปสกัดน้ำมัน

3.1.1.2 เนยโกโก้ (Delfi DF 200, Pure prime press deodorised) จากบริษัท ซีโน แปซิฟิก เทรดดิ้ง (ไทยแลนด์) จำกัด

3.1.1.3 น้ำมันปาล์มมิดเฟรคชั่น ได้จากบริษัท มรกต อินดัสตรีส์ จำกัด (มหาชน)

3.1.1.4 เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐาน จากบริษัท แอคคิวสแตนด์การ์ด อินคอร์ปอเรชัน (AccuStandard, Inc.)

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 เฮกเซน (Hexanes, Mallinckrodt chemical, UN 1208)

3.1.2.2 ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether, Mallinckrodt chemical, UN 1268)

3.1.2.3 โพรพานอล (2-Propanol, Merck, UN 1219)

3.1.2.4 โทลูอิน (Toluene, Panreac quimica sau, UN 1294)

3.1.2.5 เมทานอล (Methanol (Died) $\geq 99.9\%$ assay, Ajax finechem, UN 1230)

3.1.2.6 เอ็น-เฮปเทน (n-Heptane $\geq 99.5\%$ assay, Ajax finechem, UN 1206)

3.1.2.7 สารละลายวิจส์ (Wij's solution, $c(\text{ICI}) = 0.1 \text{ mol/l}$, Merck, UN 2789)

3.1.2.8 เอทานอล (Ethanol 95% (v/v))

3.1.2.9 โบรอนไตรฟลูออไรด์ในเมทานอล ความเข้มข้นประมาณ 1.3 โมลาร์ (Boron trifluoride ($\sim 1.3 \text{ M}$) in methanol, Fluka 15715)

- 3.1.2.10 กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (Hydrochloric acid, c(HCl) = 0.5 N, Merck)
- 3.1.2.11 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide $\geq$ 85% assay, Merck, UN 1813)
- 3.1.2.12 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide $\geq$ 99% assay, Merck, UN 1823)
- 3.1.2.13 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride $\geq$ 99.5% assay, Merck)
- 3.1.2.14 โซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulphate $\geq$ 99.5% assay, Ajax finechem)
- 3.1.2.15 ฟีนอล์ฟทาเลอิน อินดิเคเตอร์ (Phenolphthalein indicator, Labchem, Asia pacific specialty chemicals limited.)
- 3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย
- 3.1.3.1 เครื่องสกัดน้ำมัน (Soxhlet, Tecator Soxtec HT6)
- 3.1.3.2 ตู้อบสูญญากาศ (Vacuum oven VOS-300SD, Eyela)
- 3.1.3.3 อ่างน้ำ (water bath) แบบควบคุมอุณหภูมิได้
- 3.1.3.4 เครื่อง Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID, Shimadzu GC-2010)
- 3.1.3.5 เครื่อง pulse-Nuclear Magnetic Resonance (p-NMR) ของบริษัท BRUKER รุ่น the minispec mq20
- 3.1.3.6 เครื่อง Polarized Light Microscopy (PLM) (Olympus CH-2, Japan)
- 3.1.3.7 กล้องถ่ายรูปแบบ digital พร้อมชุด adapter สำหรับเชื่อมต่อเข้ากับ PLM Olympus CAMEDIA digital camera (model NO. C-7070 Wide Zoom, 7.1 Megapixel, Japan)
- 3.1.3.8 เครื่อง X-ray Powder Diffractometer (XRD) Rigaku TTRAX III, 18kW
- 3.1.3.9 เครื่องวัดสี (Color-viewTM Spectrophotometer, (D65), Gardner)
- 3.1.3.10 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated incubators with microprocessor program controller RD3, Binder)
- 3.1.3.11 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ FP90 Central Processor และ FP82 Microscope Hot Stage (Mettler / Toledo FP900 Thermosystem, Mettler-Toledo AG, Switzerland)

3.2 การสกัดน้ำมันเมล็ดมะม่วง

ทำการสกัดน้ำมันจากเมล็ดมะม่วงโดยประยุกต์ใช้กรรมวิธีของ Solis-Fuentes และ Duran-de-Bazua (2004) ดังต่อไปนี้

3.2.1 นำเมล็ดในมะม่วงแช่แข็งไปอบแห้งในสภาวะสุญญากาศด้วยตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 65°C จนมีปริมาณความชื้นหลงเหลืออยู่ไม่เกิน 10% (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง

3.2.2 บดเมล็ดมะม่วงอบแห้งที่ได้จนละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องปั่นละเอียด

3.2.3 สกัดน้ำมันจากเมล็ดมะม่วงผงด้วยเครื่อง Soxhlet ที่อุณหภูมิ 140°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (n-Hexane) กำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator

3.2.4 นำน้ำมันที่สกัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยการประยุกต์ใช้วิธี Wesson method ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ก จากนั้นกรองน้ำมันที่ได้ด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1 ขนาดของรูกรองเท่ากับ $11\ \mu\text{m}$) จำนวน 2 ชั้น ในตู้อบที่อุณหภูมิ 50°C เก็บน้ำมันที่ได้ให้พ้นจากแสงและอากาศที่อุณหภูมิ -4°C จนกว่าจะทำการศึกษาในขั้นตอนถัดไป

3.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของไขมันผสมและเนยโกโก้

ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของไขมันผสมระหว่างน้ำมันเมล็ดมะม่วง (MAF) และน้ำมันปาล์มมิดแฟรคชัน (PMF) อัตราส่วนต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเนยโกโก้ (CB) เพื่อหาไขมันผสมอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเนยโกโก้เลียนแบบชนิด CBE ที่มีชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ คุณสมบัติต่าง ๆ ทั้งทางเคมีและทางกายภาพ ที่เหมือนหรือใกล้เคียงกับของ CB โดยประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

3.3.1 เตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ ได้แก่ ไขมันผสมระหว่างน้ำมัน MAF และ PMF ในอัตราส่วนดังต่อไปนี้คือ 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 และ 0:100 โดยน้ำหนักของ MAF ต่อ PMF และตัวอย่าง CB ทางการค้า

3.3.2 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของไขมันผสมอัตราส่วนต่าง ๆ เปรียบเทียบกับของ CB ด้วยเครื่อง GC-FID โดยใช้ Column ATTM-wax (เฟสอยู่นิ่งหรือ stationary phase คือ 100% polyethyleneglycol ความยาว 50 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.20 ไมโครเมตร) โดยปริมาณของกรดไขมันองค์ประกอบแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้นั้นจะแสดงผลเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟ เมื่อคิดเทียบให้ร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟ ของกรดไขมันองค์ประกอบทั้งหมดรวมกันเป็นร้อยละ 100 ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

3.3.2.1 เตรียมตัวอย่างเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Methyl Ester; FAME) ตามกรรมวิธีของ AOAC (2000) ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ข

3.3.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดไขมันองค์ประกอบ ซึ่งพิจารณาจากการเกิด peaks โดยไม่เกิด fronting หรือ tailing และมีการแยกกันของ peaks อย่างชัดเจน ซึ่งได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างดังนี้ อุณหภูมิของ Injector เท่ากับ 210°C อุณหภูมิของ FID Detector เท่ากับ 280°C อุณหภูมิของ Oven เริ่มต้นที่ 120°C คงไว้ 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิขึ้นด้วยอัตรา 10 °C/min จนถึง 220°C คงไว้ 30 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกครั้งด้วยอัตรา 5°C/min จนถึง 240°C คงไว้ 30 นาที (รวมเวลาทั้งสิ้น 77 นาที) ความดันเริ่มต้นเท่ากับ 93.2 kPa ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา (Carrier gas) และ Split ratio เท่ากับ 1:100

3.3.2.3 วิเคราะห์ค่า retention time ของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐานซึ่งถูกใช้เป็น external standard ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับไขมันผสมและ CB ได้แก่ กรดลอริก (Lauric acid; C12:0) กรดไมริสติก (Myristic acid; C14:0) กรดปาล์มมิติก (Palmitic acid; C16:0) กรดปาล์มโทเลอิก (Palmitoleic acid; C16:1) กรดสเตียริก (Stearic acid; C18:0) กรดโอเลอิก (Oleic acid; C18:1) กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid; C18:2) กรดลิโนเลนิก (Linolenic acid; C18:3) กรดอาราคิดิก (Arachidic acid; C20:0) กรดบีฮีนิก (Behenic acid; C22:0) และกรดลิกโนเซอริก (Lignoceric acid; C24:0) ตามสภาวะที่ได้จากข้อ 3.3.2.2

3.3.2.4 หาค่าประกอบและอัตราส่วนของปริมาณเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟ ของกรดไขมันในไขมันผสมอัตราส่วนต่าง ๆ และ CB ที่เตรียมเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันตามข้อ 3.3.2.1 โดยเปรียบเทียบค่า Retention time กับเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐานในข้อ 3.3.2.3

3.3.3 วิเคราะห์ค่าสaponification value (Spv) ตามกรรมวิธีของ PORIM test method no. p3.1 (1995) ดังแสดงในภาคผนวก ค โดยกลีเซอไรด์ทั้งหมดจะถูกไฮโดรไลซ์เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอลด้วยแอลกอฮอล์อัลคาไลน์ (alcoholic alkali; KOH in ethanol) และกรดไขมันอิสระจะถูกทำให้เป็นกลางหรือทำให้เกิดสบู่ จากนั้นอัลคาไลน์ส่วนเกินจะถูกไตเตรตกลับด้วยสารละลายไฮโดรเจนคลอไรด์ (HCl) โดยใช้ 1% Phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ แล้วคำนวณค่า Spv ตามสมการต่อไปนี้

$$Spv = \frac{[(A - B) \times N \times 56.11]}{g \text{ oil}}$$

- เมื่อ A คือ ปริมาตร (ml) ของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรตสารตัวอย่าง
 B คือ ปริมาตร (ml) ของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรต blank
 N คือ ความเข้มข้นของ HCl (N)
 g oil คือ น้ำหนักเป็นกรัมของน้ำมันที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.3.4 วิเคราะห์ค่าไอโอดีน (Iodine value; Iv) โดยใช้เครื่องไตเตรตอัตโนมัติ (Mettler Toledo DL58 titrator)

3.3.5 วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด (Acid value; Av) โดยประยุกต์ใช้กรรมวิธีของ AOCS (1989) ดังแสดงในภาคผนวก ง โดยกรดไขมันอิสระจะถูกทำให้เป็นกลางหรือทำให้เกิดสบู่ด้วยการไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยใช้ 1% Phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ แล้วคำนวณค่า Av ตามสมการต่อไปนี้

$$Av = \frac{[A \times N]}{g \text{ oil}}$$

เมื่อ A คือ ปริมาตร (ml) ของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรตสารตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของ NaOH (N)

g oil คือ น้ำหนักเป็นกรัมของน้ำมันที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.3.6 วิเคราะห์ปริมาณของไขมันแข็ง (เป็น %) ที่อยู่ในรูปผลึกหรือ solid fat content (SFC) และพฤติกรรมกาหลอมเหลวด้วยเครื่อง p-NMR ตามวิธีของ AOCS: direct method (2000) ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 15-40°C ด้วยกรรมวิธีดังแสดงไว้ในภาคผนวก จ ซึ่งจะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า SFC (%; แกน y) และอุณหภูมิ (°C; แกน x)

3.3.7 วิเคราะห์จุดหลอมเหลวแบบ slip melting point (SMP) ตามกรรมวิธีของ PORIM test method no. p4.2, 1995 ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ฉ

3.4 การคัดเลือกไขมันผสมอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการนำไปใช้เป็น CBE

ทำการคัดเลือกไขมันอัตราส่วนที่เหมาะสมโดยดูจากไขมันผสมที่มีองค์ประกอบกรดไขมัน (จากการศึกษาในข้อ 3.3.2) ค่า SFC ซึ่งแสดงพฤติกรรมกาหลอมเหลว (จากการศึกษาในข้อ 3.3.6) และค่า SMP (จากการศึกษาในข้อ 3.3.7) ที่ใกล้เคียงกับของ CB มากที่สุด ซึ่ง CBE คุณภาพสูงนั้นควรมีคุณสมบัติทั้ง 3 ประการ ใกล้เคียงกับของ CB

3.5 การวิเคราะห์ความเข้ากันได้ (Compatibility) ของไขมันผสมอัตราส่วนที่เลือกกับเนยโกโก้

ทำการวิเคราะห์ความเข้ากันได้ของไขมันผสมจากข้อ 3.4 กับ CB โดยผสมไขมันผสมอัตราส่วนที่เลือกกับ CB ด้วยอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 และ 0:100 (w/w) แล้ววัดค่า SFC ที่อุณหภูมิ 20°C โดยการเตรียมตัวอย่างตามวิธีของ AOCS (2000) จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า SFC (%) กับปริมาณ (%) ของไขมันผสมอัตราส่วนที่เลือก

3.6 การศึกษาพฤติกรรมการตกผลึกของน้ำมันเมล็ดมะม่วง น้ำมันปาล์มมิดแฟรคชัน ไขมันผสมระหว่างน้ำมันเมล็ดมะม่วงและน้ำมันปาล์มมิดแฟรคชันในอัตราส่วนที่เลือกไว้ และไขมันผสมของอัตราส่วนที่เลือกที่ผสมกับเนยโกโก้เปรียบเทียบกับพฤติกรรมการตกผลึกของเนยโกโก้ ดังนี้

3.6.1 เตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาพฤติกรรมการตกผลึก 5 ตัวอย่าง ดังต่อไปนี้

3.6.1.1 MAF

3.6.1.2 PMF

3.6.1.3 ไขมันผสมระหว่าง MAF และ PMF ที่คัดเลือกได้จากไขมันผสมในหัวข้อ 3.4 ซึ่งแทนที่ cocoa butter equivalent หรือ CBE

3.6.1.4 ไขมันผสมระหว่าง CBE กับ CB ตามอัตราส่วนสูงสุดที่ยินยอมให้เติม CBE ในผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตได้โดย EU Chocolate Directive นั่นคือ อนุญาตให้เติม CBE ลงในผลิตภัณฑ์ได้ไม่เกิน 5% โดยน้ำหนักของผลิตภัณฑ์สุดท้าย ถ้าให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณไขมันทั้งหมดในช็อกโกแลตธรรมดา (dark chocolate) เป็น 33.2% (w/w) ของน้ำหนักผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Talbot, 1999) แสดงว่าช็อกโกแลตที่มีการเติมไขมันผสมที่เป็น CBE ปริมาณ 5% โดยน้ำหนักของช็อกโกแลต จะมีปริมาณเนยโกโก้อยู่ $33.2\% - 5\% = 28.2\%$ และจะมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไขมันผสมที่เป็น CBE ต่อเนยโกโก้เป็น 5:28.2 หรือ 1:5.64 นั่นเอง ซึ่งตัวอย่างนี้จะเรียกว่า MIX

3.6.1.5 CB

3.6.2 ศึกษาพฤติกรรมการตกผลึกของ MAF, PMF, CBE, MIX และ CB ที่อุณหภูมิของการตกผลึก 20°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาพฤติกรรมการตกผลึกของ CB ตามที่มีรายงานไว้โดย Sonwai และ Mackley (2006) ว่าเป็นอุณหภูมิที่ใช้เวลาไม่นานเกินไปก่อนที่การตกผลึกจะเริ่มขึ้น (หรือใช้เวลาไม่เกิน 5 นาที นับจากจุดที่เริ่มจับเวลา)

3.6.2.1 ศึกษาระยะเวลาที่ใช้ก่อนการเริ่มตกผลึก รูปร่างผลึก จำนวนและขนาดของผลึก และการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างผลึก จำนวนและขนาดของผลึกตามเวลาโดยใช้เทคนิค PLM ร่วมกับกล้องถ่ายภาพแบบ digital และกำลังขยายของเลนส์วัตถุเท่ากับ x50

การทดลองจะเริ่มจากการให้ความร้อนกับตัวอย่างไขมันที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเป็นการทำลายโครงสร้างผลึกของส่วนที่เป็นของแข็ง (memory effect) ให้หมดไป จากนั้นลดอุณหภูมิลงเพื่อให้เกิดการตกผลึกที่ 20°C ในสถานะนิ่ง (หรือไม่มีการปั่นกวนระหว่างการตกผลึก) ด้วยอัตราเร็ว 2°C/min เริ่มจับเวลาทันทีที่อุณหภูมิลดลงมาถึง 20°C และให้เวลาที่ใช้ในการตกผลึกสำหรับการทดลองเป็น 1 ชั่วโมง ทั้งนี้ระหว่าง 1 ชั่วโมงของการทดลองจะต้องรักษาอุณหภูมิของตัวอย่างให้คงที่ตลอดเวลา ($\pm 0.2^\circ\text{C}$) โดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งค่าไว้ที่อุณหภูมิที่ใช้ตกผลึกเพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง ขนาด และจำนวนของผลึกระหว่างการบันทึกภาพ และเพื่อให้การตกผลึกเป็นไปในแบบที่อุณหภูมิคงที่ตลอดการตกผลึก (isothermal) ทำการสังเกตลักษณะ

ของผลึกที่เกิดขึ้นพร้อมบันทึกภาพ ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ ของการตกผลึก (ทุก ๆ 2 นาทีในช่วง 20 นาทีแรก และทุก ๆ 5 นาทีหลังจากนั้น) แล้วนำภาพที่บันทึกได้ไปประมวลผลด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS3 Extended version 10.0 (Adobe Systems Incorporated, United States) เพื่อทำการนับจำนวนและวัดขนาดของผลึก

3.6.2.2 ศึกษาหลักการตกผลึกของไขมันตัวอย่างด้วยเครื่อง p-NMR โดยประยุกต์ใช้กรรมวิธีของ AOCS (2000) ติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า SFC ของไขมันตัวอย่างตามเวลาที่อุณหภูมิ 20°C ตลอดระยะเวลา 1 ชั่วโมง โดยเตรียมตัวอย่างไขมันใส่หลอด p-NMR สูงประมาณ 4 เซนติเมตร แล้วละลายไขมันที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง p-NMR ที่ควบคุมอุณหภูมิของที่ใส่หลอดตัวอย่างไว้ที่ 20°C เริ่มจับเวลา ($t = 0$ min) เมื่ออุณหภูมิของตัวอย่างลดลงเป็น 20°C วัดค่า SFC ตามเวลาโดยวัดทุก ๆ 1 นาที เป็นเวลา 20 นาที ทุก ๆ 2 นาทีจนครบ 1 ชั่วโมง เพื่อศึกษาระยะเวลาก่อนการเริ่มตกผลึก ความเร็วช้าของการตกผลึก และระดับการตกผลึกสูงสุดจากค่า SFC ที่วัดได้ของไขมันแต่ละตัวอย่าง โดยการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า SFC กับระยะเวลาในการตกผลึก (นาที)

3.6.2.3 ศึกษาลักษณะโครงสร้างผลึกและการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผลึกตามเวลา โดยใช้เครื่อง XRD และเก็บข้อมูลในช่วง 2θ เท่ากับ 18-26 องศา (step width เท่ากับ 0.02 องศา อัตราเร็วเท่ากับ 2.7 องศาต่อวินาที) ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผลึกโดยละลายตัวอย่างที่ 60°C เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วลดอุณหภูมิไปที่ 20°C เริ่มจับเวลาทันที ($t = 0$ min) วิเคราะห์โครงสร้างผลึกทุก ๆ 5 นาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวัดทุก ๆ 10 นาที จนครบ 60 นาที แล้วคำนวณค่า d-short spacing จากสมการของแบรกก์ (1) ซึ่งมีค่าความยาวคลื่น (λ) ที่ใช้ในการคำนวณค่า d-short spacing เท่ากับ 1.5404 Å (Cu/K-alpha)

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (1)$$

3.7 การศึกษาการเกิด fat bloom ของไขมัน

ศึกษาการเกิด fat bloom ของ CBE และไขมันผสมระหว่าง CBE กับ CB ด้วยอัตราส่วน 1:5.64 (w/w) หรือ MIX เปรียบเทียบกับพฤติกรรมการเกิด fat bloom ของ CB โดยทำการ tempering ไขมันตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง ในหม้อตกผลึกแบบ double-jacket ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างได้พร้อมกับการปั่นกวนตัวอย่างตลอดเวลา โดยให้ความร้อนกับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิไปที่ 24°C จนกระทั่งเริ่มเกิดการตกผลึกในโครงสร้างที่ไม่เสถียรขึ้นเป็นจำนวนมากซึ่งตัวอย่างมีลักษณะขุ่น มีความหนืดเพิ่มขึ้น และมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 24°C เล็กน้อย แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 30°C ทันทีจนใช้เวลา 6 นาที เพื่อให้ผลึกที่ได้อยู่ในรูปแบบที่ V หรือ β_2 ซึ่งเป็นรูปแบบที่ต้องการ (ตรวจสอบโครงสร้างผลึกที่ได้ด้วย XRD ดังแสดงในภาคผนวก ข) แล้วเทลงแบบ

พิมพ์ จากนั้นทำให้แข็งตัวที่อุณหภูมิ 18°C เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25°C ในตู้บ่ม
ควบคุมอุณหภูมิเป็นระยะเวลา 6 เดือน ทำการวัดสีเริ่มต้นด้วยเครื่องวัดสี และติดตามการเปลี่ยนแปลงสี
ระหว่างการเก็บรักษาทุก ๆ 1 เดือน ซึ่งจะได้ค่าพารามิเตอร์ L^* , a^* และ b^* แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา
ค่า whiteness index (WI) โดยใช้สมการ (2) (Sonwai และ Rousseau, 2006)

$$WI = 100 - \left[(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2} \right]^{1/2} \quad (2)$$